

小窝蛋白-1 脚手架区结构域多肽对脂多糖诱导肺泡巨噬细胞血红素加氧酶-1 活性增加及 M1/M2 表型极化的影响

洪侃 郁志明 孙雪倩 吴晨 翁平 魏明霞 左静 陈俊良 庞庆丰

214043 江苏无锡,无锡市人民医院老年医学科(洪侃),心血管内科(郁志明);214122 江苏无锡,江南大学无锡医学院病理生理学教研室(孙雪倩、吴晨、翁平、魏明霞、左静、陈俊良、庞庆丰)

通讯作者:庞庆丰,Email:qfpang@jiangnan.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.09.007

【摘要】 目的 探讨小窝蛋白-1 脚手架区结构域(CSD)多肽对脂多糖(LPS)诱导肺泡巨噬细胞(AMs)血红素加氧酶-1(HO-1)活性增加和 M1/M2 表型极化的影响。方法 应用生物信息学方法分析全长野生型 CSD 多肽和 101 位氨基酸缺失的截短型突变 CSD 多肽($\Delta 101\text{CSD}$)与 HO-1 的结合情况。分离纯化培养大鼠原代 AMs,细胞融合达到 80% 时无血清培养基进行同步化处理,并分为 5 组:空白对照组不予任何处理;LPS 组加入 100 $\mu\text{g/L}$ 的 LPS 处理 16 h;LPS + 血晶素组加入 100 $\mu\text{g/L}$ 的 LPS 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 血晶素处理 16 h;野生型 CSD 多肽 + LPS + 血晶素组在 LPS 处理前 6 h 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 野生型 CSD 多肽预处理; $\Delta 101\text{CSD}$ + LPS + 血晶素组在 LPS 处理前 6 h 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ $\Delta 101\text{CSD}$ 预处理。各组处理 16 h 后,激光共聚焦显微镜下观察 AMs 细胞膜小窝蛋白-1(Cav-1)与 HO-1 的结合情况;采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)以及 AMs 的 M1 型标志物肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和 M2 型标志物白介素 10(IL-10)的 mRNA 表达;采用分光光度计检测 HO-1 活性及一氧化氮(NO)含量。结果 生物信息学分析结果显示:野生型 CSD 和 $\Delta 101\text{CSD}$ 多肽均能与 HO-1 结合,且二者结合能力无明显差异;但 101 位 Arg 缺失导致 $\Delta 101\text{CSD}$ 多肽与 HO-1 的部分结合区域消失。激光共聚焦显微镜下观察结果显示:空白对照组 Cav-1 和 HO-1 均低表达;LPS 组和 LPS + 血晶素组 Cav-1 与 HO-1 大量结合;野生型 CSD 和 $\Delta 101\text{CSD}$ 多肽均能明显减少 LPS 诱导的 HO-1 与 Cav-1 结合。HO-1 活性分析结果显示:给予 LPS 刺激后,HO-1 活性较空白对照组明显升高;血晶素可促进 LPS 诱导 HO-1 活性升高;给予两种 CSD 多肽预处理后,HO-1 活性均进一步升高,以野生型 CSD 多肽作用更加显著,与 LPS + 血晶素组比较差异有统计学意义($\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$: $3\,683 \pm 266$ 比 $2\,408 \pm 132$, $P < 0.05$)。RT-qPCR 检测结果显示:LPS 可诱导细胞炎症因子及 M1 型标志物水平升高, M2 型标志物水平下降;而血晶素可抑制 LPS 诱导的炎症反应及 M1/M2 表型极化。与 LPS + 血晶素组相比,给予野生型 CSD 多肽预处理后,AMs 中炎症因子水平降低,同时可降低 M1 型标志物 TNF- α 和 iNOS 的 mRNA 表达水平[TNF- α mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$): 6.82 ± 0.05 比 8.70 ± 0.24 , iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$): 331.50 ± 32.05 比 506.70 ± 0.10 , 均 $P < 0.05$],增加 M1 型标志物 IL-10 mRNA 的表达水平($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: 269.09 ± 6.54 比 119.05 ± 3.30 , $P < 0.05$);而 101 位缺失部分削弱了 CSD 多肽对炎症因子的抑制作用,且只能降低 iNOS mRNA 的表达水平($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: 429.11 ± 8.92 比 506.70 ± 0.10 , $P < 0.05$),说明其促使 AMs 由 M1 表型向 M2 表型转化的能力较差。两种多肽对 CD206 的表达均无影响。结论 野生型 CSD 多肽可减少 LPS 诱导的 Cav-1 与 HO-1 结合,增加 HO-1 活性,促进 AMs 由 M1 表型向 M2 表型转化,抑制促炎因子表达。

【关键词】 小窝蛋白-1 脚手架区结构域多肽; 血红素加氧酶-1; 肺泡巨噬细胞; 炎症因子

基金项目:国家自然科学基金(81270126)

Effect of caveolin-1 scaffolding domain peptides on heme oxygenase-1 activity increasing and M1/M2 phenotype polarization in rat alveolar macrophages induced by lipopolysaccharide Hong Kan, Yu Zhiming, Sun Xueqian, Wu Chen, Weng Ping, Wei Mingxia, Zuo Jing, Chen Junliang, Pang Qingfeng
Department of Geriatric Medicine, Wuxi People's Hospital, Wuxi 214043, Jiangsu, China (Hong K); Department of Cardiology, Wuxi People's Hospital, Wuxi 214043, Jiangsu, China (Yu ZM); Department of Pathophysiology, Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China (Sun XQ, Wu C, Weng P, Wei MX, Zuo J, Chen JL, Pang QF)

Corresponding author: Pang Qingfeng, Email: qfpang@jiangnan.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of caveolin-1 scaffolding domain (CSD) peptides on heme oxygenase-1 (HO-1) activity increasing and M1/M2 phenotype polarization in rat alveolar macrophages (AMs) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Bioinformatics was used to analyze the binding of full-length wild-type CSD polypeptide and 101 amino acid deleted truncated mutant CSD polypeptide ($\Delta 101\text{CSD}$) to HO-1. Primary AMs were

isolated from rats, when cell fusion reached 80%, they were synchronized with serum-free medium and divided into five groups: no treatment was given to the blank control group; LPS group was treated with 100 $\mu\text{g/L}$ LPS for 16 hours; LPS + hemin group was treated with 100 $\mu\text{g/L}$ LPS and 20 $\mu\text{mol/L}$ hemin for 16 hours; wild-type CSD polypeptide + LPS + hemin group was pretreated with 10 $\mu\text{mol/L}$ wild-type CSD polypeptide 6 hours before LPS treatment; $\Delta 101\text{CSD}$ + LPS + hemin group was pretreated with 10 $\mu\text{mol/L}$ $\Delta 101\text{CSD}$ polypeptide 6 hours before LPS treatment. After treatment for 16 hours, the co-localization between caveolin-1 (Cav-1) and HO-1 was displayed by confocal microscope; the mRNA expressions of inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and M1/M2 polarization cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), leukocyte differentiation antigen 206 (CD206) and IL-10 were determined by real-time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR); the HO-1 activity and nitric oxide (NO) production were determined by spectrophotometry. **Results** Bioinformatics analysis showed: both wild-type CSD and $\Delta 101\text{CSD}$ peptides could bind to HO-1, and there was no significant difference in the binding ability between the two peptides, but the deletion of 101 Arg resulted in the disappearance of part of the binding region between $\Delta 101\text{CSD}$ and HO-1. The results of laser confocal microscopy showed: the expressions of Cav-1 and HO-1 were lowed in the blank control group, and Cav-1 was bound to HO-1 in LPS group and LPS + hemin group. Both wild-type CSD and $\Delta 101\text{CSD}$ peptides pretreatment could significantly reduce the binding of HO-1 to Cav-1 induced by LPS. HO-1 activity analysis showed: after LPS stimulation, the activity of HO-1 was significantly higher than that of the blank control group; the activity of HO-1 induced by LPS was increased by hemin; after pretreatment with two kinds of CSD peptides, the activity of HO-1 was further increased, and the effect of wild-type CSD peptide was more significant, which showed a statistically significant difference as compared with that of LPS + hemin group ($\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$: $3\,683 \pm 266$ vs. $2\,408 \pm 132$, $P < 0.05$). RT-qPCR results showed: LPS could induce elevation of cytokines and M1 markers and decrease of M2 markers, while hemin could inhibit LPS-induced inflammatory response and M1/M2 phenotypic polarization. Compared with LPS + hemin group, after pretreatment with wild-type CSD peptide, the levels of inflammatory factors in AMs were decreased, and the mRNA expression levels of TNF- α and iNOS, M1 markers, were decreased [TNF- α mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$): 6.82 ± 0.05 vs. 8.70 ± 0.24 , iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$): 331.50 ± 32.05 vs. 506.70 ± 0.10 , both $P < 0.05$], and IL-10 mRNA expression level was increased ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: 269.09 ± 6.54 vs. 119.05 ± 3.30 , $P < 0.05$). The deletion of 101 site partially weakened the inhibitory effect of CSD peptides on inflammatory factors and only reduced the expression of iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: 429.11 ± 8.92 vs. 506.70 ± 0.10 , $P < 0.05$), indicating that its ability to transform AMs from M1 phenotype to M2 phenotype was poor. The two peptides had no effect on the expression of CD206. **Conclusion** Wild-type CSD had beneficial effects of anti-inflammation by reducing Cav-1 binding to HO-1 induced by LPS, restoring the HO-1 activity and driving M2 phenotype in alveolar macrophages.

【Key words】 Caveolin-1 scaffolding domain peptide; Heme oxygenase-1; Alveolar macrophage; Inflammatory cytokine

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81270126)

急性肺损伤 (ALI) 发病率高, 其病因包括感染、休克和缺血 / 再灌注损伤等^[1], 目前尚无有效治疗药物。小窝蛋白-1 (Cav-1) 是细胞膜小窝的重要组成部分, 其 82 ~ 101 位氨基酸序列被称为小窝蛋白-1 脚手架区结构域 (CSD), 对实现细胞信号转导、物质跨膜转运等生物学功能发挥重要作用^[2-3]。血红素加氧酶-1 (HO-1) 是血红素分解代谢的限速酶, 催化血红素分解产生 Fe^{2+} 、一氧化碳和胆绿素^[4], 通过促使 Cav-1 酪氨酸残基磷酸化可以抑制 HO-1 表达, 从而加重机械通气相关性 ALI^[5]。研究表明, HO-1 与 Cav-1 的最小结合区域为 97 ~ 101 位氨基酸, 且两者之间的结合可抑制 HO-1 活性^[6]。本课题组前期研究表明, 预先诱导肺泡巨噬细胞 (AMs) 中 HO-1 表达可以增加脂多糖 (LPS) 刺激下精氨酸酶活性和吞噬能力^[7], 但 CSD 对 HO-1 活性的内源性抑制限制了其对 LPS 诱导 ALI 的保护效果。本研究拟通过 CSD 多肽减少 HO-1 与细胞膜上 Cav-1

结合以解决 HO-1 的内源性抑制问题, 进而对 ALI 发挥有效的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 清洁级雄性 SD 大鼠, 6 ~ 8 周龄, 体重 200 ~ 280 g, 由上海斯莱克实验动物中心提供, 许可证号: SCXK (沪) 2012-0002。本实验中大鼠处置方法符合动物伦理学标准, 并通过江南大学动物伦理委员会审批 (审批号: 20130406)。

1.2 主要试剂: 全长野生型 CSD 多肽 (Cav-1 的 82 ~ 101 位氨基酸序列, 即 DGIWKASFTTFTVTKYWFR) 和截短型突变 CSD 多肽 ($\Delta 101\text{CSD}$, Cav-1 的 82 ~ 100 位氨基酸序列, 即 DGIWKASFTTFTVTKYWFY), 两个多肽在 C 末端均连有黑腹果蝇触足肽 (AP, 氨基酸序列为 RQIKIWFQNRRMKWKK), 由上海强耀生物技术有限公司合成; DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司, LPS、血晶素及 HO-1 活性检测试剂均购自美国 Sigma 公司, Cav-1 兔单克隆抗

体及 HO-1 鼠多克隆抗体购自美国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔及山羊抗鼠 IgG 抗体购自武汉博士德生物有限公司,异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗鼠 IgG 以及德克萨斯红(TR)标记山羊抗兔 IgG 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;所用引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 原代 AMs 的分离纯化培养:参考何俊等^[8]建立的方法分离原代 AMs。麻醉大鼠后引颈处死;全身消毒后将其头尾固定在手术台上,并进行气管插管;打开胸腔,暴露肺,用 4 °C 磷酸盐缓冲液(PBS)经气管灌洗肺,每次 3~5 mL,灌洗 5 次,灌洗液回收率为 80% 以上。灌洗液 4 °C 离心 10 min 弃上清,再用 PBS 洗涤 2 次,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬沉淀细胞制成单细胞悬液。在倒置显微镜下进行细胞计数和锥虫蓝拒染试验以检测细胞活性,根据实验需要调整细胞密度,每孔细胞密度为 1×10^7 /mL,接种于培养板。在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h,弃上清,加入含 10% 胎牛血清的新鲜 DMEM 培养基,继续培养 24 h,细胞融合达到 80% 时使用无血清培养基进行同步化处理,开展后续实验。

1.4 细胞分组及处理:将原代 AMs 接种于激光共聚焦专用小皿内,同步化培养后分为 5 组。空白对照组不给予任何处理;LPS 组给予 100 μg/L 的 LPS 处理 16 h;LPS + 血晶素组给予 100 μg/L 的 LPS 和 20 μmol/L 血晶素处理 16 h;野生型 CSD 多肽 + LPS + 血晶素组给予 10 μmol/L 野生型 CSD 多肽预处理 6 h 后,加入 LPS 和血晶素处理 16 h^[9];Δ101CSD + LPS + 血晶素组给予 10 μmol/L Δ101CSD 多肽预处理 6 h 后,加入 LPS 和血晶素处理 16 h。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 分子对接与分子动力学模拟:HO-1 的三维结构来源于 PDB 数据库,经文本编辑器 Notepad++ 处理,去除血红素以及结晶水后作为分子对接的受体。使用 I-TASSER 软件(<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)对多肽的三维结构进行预测及优化,获得的多肽分子作为配体。HO-1 与小分子多肽的分子对接采用 AutoDock 4.2 软件进行,对接过程中受体格点盒子的大小设定为:55 Å × 45 Å × 45 Å,对接中心设置坐标为:-1.48 Å、-8.38 Å、-2.41 Å,对接的计算方法为拉马克遗传算法,最大能量水平为 1×10^7 kJ/mol,其他设置均为默认值。使用 Gromacs 4.5.5 软件进行分子动力学模拟^[10]。根据模拟结果提取各分子模拟最终稳定的

蛋白质构象,重复上述能量最小化过程,并且使用 Ligplus 和 PyMol 软件分析对接结果。针对构建好的酶底物复合物,采用分子力学泊松-波尔兹曼表面积法(MM-PBSA)计算结合自由能参数^[11],包括静电力(Eelec)、范德华力(Evdw)、液相部分自由能(Gsolv)、极性溶解自由能(Gpolar)和非极性溶解自由能(Gnonpolar)。观察上述结合自由能参数在一定变化过程中,达到平衡后的能量变化量(Δ)。结合前一般设为 0,计算结合达到稳定时各参数数值与 0 的差值,负值越大,说明两者的结合程度越高。

1.5.2 免疫荧光检测 Cav-1 与 HO-1 的结合情况:细胞处理 16 h 后用 4% 多聚甲醛固定 30 min;PBS 洗涤 3 min × 5 次;0.2% 曲拉通 X-100 透明 15 min;PBS 洗涤 3 min × 5 次;5% BSA 室温封闭 1 h;弃上清,4 °C 过夜孵育 Cav-1 和 HO-1(1:500)的一抗混合液;PBS 洗涤 5 min × 5 次;室温孵育 FITC 标记山羊抗鼠 IgG 和 TR 标记山羊抗兔 IgG 荧光二抗混合液(1:200)1 h;PBS 洗涤 5 min × 5 次后激光共聚焦显微镜下观察并拍照,绿色荧光代表 HO-1 蛋白,红色荧光代表 Cav-1 蛋白,两者结合显示黄色荧光。

1.5.3 白细胞介素-1β(IL-1β)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)以及 AMs 的 M1 型标志物肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和 M2 型标志物白细胞分化抗原 206(CD206)、IL-10 的 mRNA 表达检测:采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测。细胞处理 16 h 后提取细胞总 RNA,检测 RNA 纯度及浓度。参照反转录说明书进行 1 μg RNA 反转录。采用荧光定量 PCR 试剂盒上样,反应体积为 20 μL。按照荧光定量反应试剂盒说明书,采用罗氏 480 PCR 仪实施 PCR 循环。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法,以空白对照组数值为 1,观察目的基因表达的变化倍数。

1.5.4 HO-1 活性检测:收集 AMs 细胞,加入 RIPA 细胞裂解液,收集上清,通过检测胆红素生成量评估 HO-1 活性^[12]。反应总体积为 200 μL,加入还原型辅酶 II(NADPH)后反应即开始,37 °C 避光反应 1 h,立即置于冰上终止反应。用 1 倍体积的氯仿萃取,获得上清,采用分光光度计测定 464 nm 和 530 nm 波长处的吸光度值(A₄₆₄ 和 A₅₃₀),计算 HO-1 活性。

1.5.5 一氧化氮(NO)含量检测:收集细胞培养液上清,采用硝酸还原酶法检测 NO 含量,操作按试剂盒(南京建成工程生物研究所)说明书进行。

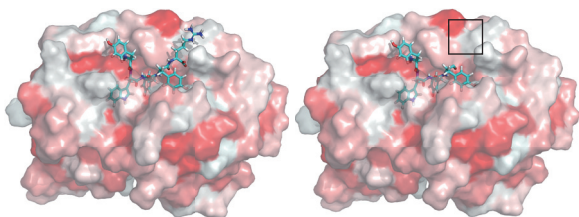
1.6 统计学分析:用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。每项实验重复 3 次。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用最小显著差异法 (LSD 法)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CSD 多肽与 HO-1 的结合能力(表 1; 图 1):分子对接及分子动力学模拟显示,野生型 CSD 多肽和 $\Delta 101$ CSD 多肽与 HO-1 间的 ΔE_{elec} 、 ΔE_{vdw} 、 ΔG_{solv} 、 ΔG_{polar} 为负值,提示两种 CSD 多肽均可与 HO-1 结合,形成稳定复合物。空间模拟结构显示, $\Delta 101$ CSD 多肽中 4 个氨基酸与 HO-1 的结合方式同野生型 CSD 多肽类似,但 101 位 Arg5 缺失致 CSD 多肽与 HO-1 部分结合区域消失。

CSD 多肽	结合自由能 (kJ/mol)				
	ΔE_{elec}	ΔE_{vdw}	ΔG_{solv}	ΔG_{polar}	$\Delta G_{nonpolar}$
野生型 CSD 多肽	-1 344.7	-330.2	-264.7	-38.8	1 490.8
$\Delta 101$ CSD 多肽	-1 222.6	-243.7	-291.7	-32.6	1 208.0

注:CSD 为小窝蛋白-1 脚手架区结构域, $\Delta 101$ CSD 为截短型突变 CSD 多肽,HO-1 为血红素加氧酶-1, ΔE_{elec} 、 ΔE_{vdw} 、 ΔG_{solv} 、 ΔG_{polar} 、 $\Delta G_{nonpolar}$ 分别为以 0 为基础值,CSD 多肽与 HO-1 结合稳定时,静电力、范德华力、液相部分自由能、极性溶解自由能和非极性溶解自由能的变化值



注:CSD 为小窝蛋白-1 脚手架区结构域, $\Delta 101$ CSD 为截短型突变 CSD 多肽,HO-1 为血红素加氧酶-1;棒状结构代表 CSD 多肽氨基酸序列,红灰相间的块状结构代表 HO-1 蛋白质;右图黑框显示氨基酸缺失使 $\Delta 101$ CSD 与 HO-1 部分结合区域消失

图 1 野生型 CSD 多肽(左)和 $\Delta 101$ CSD 多肽(右)与 HO-1 结合的模拟空间结构

2.2 CSD 多肽对 Cav-1 与 HO-1 结合的影响(图 2):LPS 组和 LPS + 血晶素组 HO-1 与 AMs 细胞膜 Cav-1 的结合数量均较空白对照组明显增加;给予野生型 CSD 多肽和 $\Delta 101$ CSD 多肽预处理后,HO-1 与 Cav-1 结合数量明显减少;但两种多肽无明显差异。

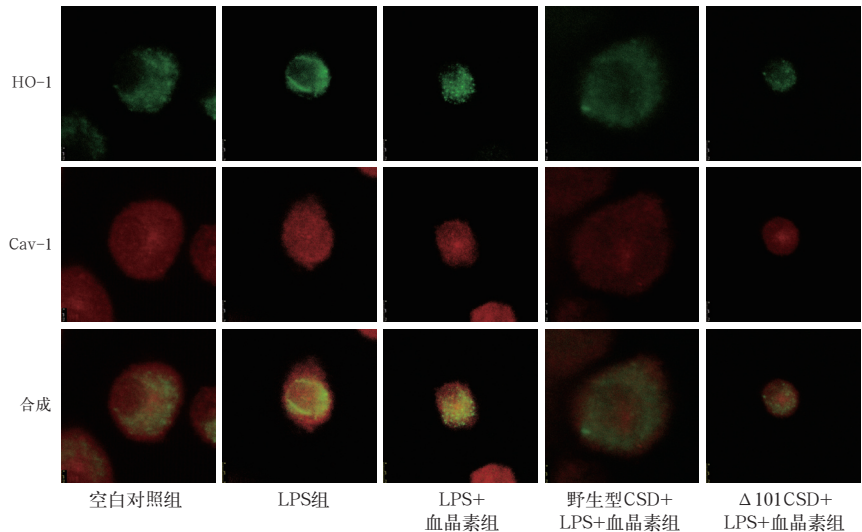
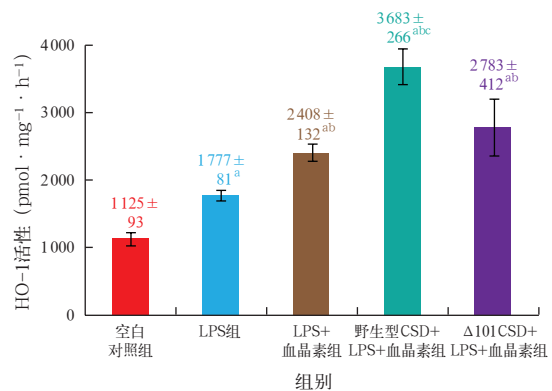


图 2 激光共聚焦显微镜下观察各组肺泡巨噬细胞 (AMs) 细胞膜小窝蛋白-1 (Cav-1) 与血红素加氧酶-1 (HO-1) 的结合情况 细胞荧光标记 HO-1 为绿色, Cav-1 为红色,两者结合为黄色。空白对照组 HO-1 含量较少,黄色荧光弱;脂多糖 (LPS) 和 LPS + 血晶素组黄色荧光明显增加,提示 Cav-1 与 HO-1 大量结合;给予野生型小窝蛋白-1 脚手架区结构域 (CSD) 多肽和截短型突变 CSD 多肽 ($\Delta 101$ CSD) 多肽预处理后,黄色荧光明显减少,提示 Cav-1 与 HO-1 的结合减少,但两者间无明显差异 免疫荧光染色 高倍放大

2.3 CSD 多肽对 HO-1 活性的影响(图 3):LPS 刺激后,HO-1 活性较空白对照组明显升高 ($P < 0.05$);血晶素可促进 LPS 诱导 HO-1 活性升高 ($P < 0.05$);给予 CSD 多肽预处理后,HO-1 活性进一步升高,以野生型 CSD 多肽的作用更加显著,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。提示野生型 CSD 多肽能够有效提高 HO-1 活性。



注:CSD 为小窝蛋白-1 脚手架区结构域,LPS 为脂多糖,AMs 为肺泡巨噬细胞,HO-1 为血红素加氧酶-1, $\Delta 101$ CSD 为截短型突变 CSD 多肽;与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$;与 LPS + 血晶素组比较,^c $P < 0.05$

图 3 CSD 多肽预处理对 LPS 诱导 AMs 细胞 HO-1 活性的影响

2.4 CSD 多肽对炎症因子表达的影响(表 2):与空白对照组相比,LPS 组 AMs 中 IL-1 β 、MCP-1 的 mRNA 表达和 NO 含量均明显升高 (均 $P < 0.05$);血晶素可不同程度抑制 LPS 诱导的 AMs 中炎症因子大量释放;给予野生型 CSD 多肽预处理后,AMs

中 IL-1β、MCP-1 的 mRNA 表达和 NO 含量均明显降低(均 $P < 0.05$); 而 101 位缺失部分削弱了 CSD 多肽对 IL-1β、MCP-1 mRNA 表达和 NO 含量的抑制作用。说明野生型 CSD 多肽能够有效抑制多种促炎因子的表达。

表 2 CSD 多肽预处理对 LPS 诱导 AMs 炎症因子 mRNA 表达及 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	IL-1β mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	MCP-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	NO 含量 ($\mu\text{mol/L}$)
空白对照组	3	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.09	4.92 ± 1.32
LPS 组	3	102.74 ± 14.59 ^a	142.87 ± 14.79 ^a	121.21 ± 9.64 ^a
LPS + 血晶素组	3	94.32 ± 7.22 ^a	120.31 ± 4.17 ^{ab}	114.02 ± 10.85 ^a
野生型 CSD 多肽 + LPS + 血晶素组	3	48.62 ± 1.09 ^{abc}	62.30 ± 3.02 ^{abc}	90.46 ± 15.36 ^{abc}
Δ101CSD + LPS + 血晶素组	3	82.55 ± 2.89 ^a	96.58 ± 2.35 ^{abc}	99.51 ± 8.96 ^{abc}

注: CSD 为小窝蛋白-1 脚手架区结构域, LPS 为脂多糖, AMs 为肺泡巨噬细胞, NO 为一氧化氮, Δ101CSD 为截短型突变 CSD 多肽, IL-1β 为白细胞介素-1β, MCP-1 为单核细胞趋化蛋白-1; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 LPS + 血晶素组比较, ^c $P < 0.05$

2.5 CSD 多肽对 AMs 表型标志物表达的影响 (表 3): 与空白对照组, LPS 组 AMs 的 M1 型标志物 TNF-α、iNOS 和 M2 型标志物 IL-10 的 mRNA 表达量明显升高, 而 M2 型标志物 CD206 mRNA 表达量则明显下降(均 $P < 0.05$); 血晶素可不同程度抑制 LPS 诱导的 M1/M2 型极化; 给予野生型 CSD 多肽预处理后, TNF-α 和 iNOS 的 mRNA 表达进一步降低, IL-10 mRNA 表达进一步升高(均 $P < 0.05$); 而 101 位的缺失部分削弱了 CSD 多肽对 M1/M2 型极化的影响。说明野生型 CSD 多肽可以促进 AMs 表型从 M1 型向 M2 型转变, 从而抑制 LPS 引起的炎症反应。

3 讨论

AMs 是肺组织中最多的非实质性细胞, 是肺组织固有免疫系统的第一道防线, 过度释放的炎症因子可导致肺炎“瀑布反应”, 是引起 ALI / 急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的关键原因。AMs 作为主要的炎症始动细胞发挥着至关重要的作用^[13]。在各种有害因素如游离的线粒体 DNA 刺激下, AMs 可以释放大量促炎因子, 引起 ALI。因此, 研究调控 AMs 炎症反应, 寻找减轻 AMs 炎症反应的新方法, 有助于为治疗 ALI 提供实验依据。

AP 是一种非常重要的细胞穿膜肽, 它能够协助与其相连接的多肽顺利进入细胞中。为了促进 CSD 多肽能够顺利进入细胞, 本研究中合成了 CSD

表 3 CSD 多肽预处理对 LPS 诱导 AMs 表型标志物 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	M1 型标志物表达 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	
		TNF-α	iNOS
空白对照组	3	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.06
LPS 组	3	9.25 ± 0.01 ^a	649.96 ± 47.21 ^a
LPS + 血晶素组	3	8.70 ± 0.24 ^a	506.70 ± 0.10 ^{ab}
野生型 CSD 多肽 + LPS + 血晶素组	3	6.82 ± 0.05 ^{abc}	331.50 ± 32.05 ^{abc}
Δ101CSD + LPS + 血晶素组	3	8.44 ± 0.32 ^{ab}	429.11 ± 8.92 ^{abc}

组别	样本数 (孔)	M2 型标志物表达 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	
		CD206	IL-10
空白对照组	3	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.20
LPS 组	3	0.06 ± 0.01 ^a	105.85 ± 9.88 ^a
LPS + 血晶素组	3	0.07 ± 0.01 ^a	119.05 ± 3.30 ^a
野生型 CSD 多肽 + LPS + 血晶素组	3	0.10 ± 0.01 ^a	269.09 ± 6.54 ^{abc}
Δ101CSD + LPS + 血晶素组	3	0.06 ± 0.01 ^a	221.75 ± 33.53 ^{abc}

注: CSD 为小窝蛋白-1 脚手架区结构域, LPS 为脂多糖, AMs 为肺泡巨噬细胞, Δ101CSD 为截短型突变 CSD 多肽, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, iNOS 为诱导型一氧化氮合酶, CD206 为白细胞分化抗原 206, IL-10 为白细胞介素-10; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 LPS + 血晶素组比较, ^c $P < 0.05$

多肽与 AP 多肽相连接的复合多肽, 通过激光共聚焦显微镜下观察和 HO-1 活性分析证实, 本研究成功地将外源性 CSD 多肽导入 AMs, 并且发现野生型 CSD 多肽能够有效干预 Cav-1 与 HO-1 的结合, 增加 HO-1 活性。

研究表明, Cav-1 及其磷酸化增加参与了 LPS 诱导大鼠肺微血管内皮细胞 (RPMVEC) 屏障损伤^[14], 但其机制仍未明确。Cav-1 广泛存在于肺泡上皮细胞、Clara 细胞以及 AMs 中, 其氨基酸序列的 N 端和 C 端均位于细胞质中, 肽链中间由疏水性氨基酸 (102 ~ 134 位) 形成“发夹样”结构, 为 Cav-1 跨膜区; N 端 82 ~ 101 位氨基酸残基称为 CSD。CSD 可通过氢键、π-π 键等非共价键形式, 可逆性结合酪氨酸激酶类膜受体及其下游靶分子、非受体类酪氨酸激酶、丝 / 苏氨酸激酶类膜受体、G 蛋白耦联受体, 以及下游信号分子、类固醇激素受体和内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 等不同种类蛋白质, 并可抑制这些蛋白质的功能^[15]。关于 Cav-1 对结合的靶蛋白活性内源性抑制问题, Xia^[16] 和 Bernatchez^[17] 等利用丙氨酸替代的 F92A-CSD 多肽竞争性结合 eNOS, 有效提高了 eNOS 活性。因此, 设计既能结合 HO-1 又不抑制 HO-1 活性的 CSD 多肽能够有效解除 HO-1 活性内源性抑制问题。本研究利用生物信息学技术分析比较了野生型 CSD 多肽和 Δ101CSD 多肽

对 HO-1 活性及 AMs 炎性因子表达的影响,发现野生型 CSD 多肽较突变的 CSD 多肽有更为明显的作用效果,其原因可能是:HO-1 催化血红素分解需要 NADPH、细胞色素 P450 和氧分子等共同组成一个酶催化体系,野生型 CSD 多肽能够结合和组装这些反应元件,而 Δ 101CSD 多肽则无法有效组装这些元件,因此不能提高 HO-1 的活性。

AMs 表型转化在 ALI 的发生及其预后中均发挥了关键作用。M1 型巨噬细胞具有促炎、抵抗病原体的作用,而 M2 型巨噬细胞则具有组织重塑、促纤维化的作用。因此,M1 型占优势则肺部炎症加重;而 M2 型占优势则肺损伤减轻。有研究结果显示,有效促进 AMs 由 M1 表型向 M2 表型转化是抑制肺部炎症反应、减轻肺损伤的重要方法^[18]。本研究中利用实时荧光 RT-qPCR 方法分别观察野生型 CSD 多肽和 Δ 101CSD 多肽对 AMs 表型转换及其炎性因子 IL-1 β 、MCP-1、NO 表达的影响。在 AMs 表型标志物研究中发现:野生型 CSD 多肽能够降低 AMs 的 M1 型标志物 TNF- α 和 iNOS 的 mRNA 表达水平;增加 M2 型标志物 IL-10 mRNA 的表达水平,提示野生型 CSD 多肽能够有效促使 AMs 由 M1 表型向 M2 表型转化;而 Δ 101CSD 多肽则只能降低 iNOS mRNA 的表达水平,说明 Δ 101CSD 多肽促使 AMs 由 M1 表型向 M2 表型转化的能力较差。奇怪的是,两种 CSD 多肽对 CD206 的表达均无明显影响。本研究结果还显示,两种 CSD 多肽对促炎因子的影响存在较大差异:野生型 CSD 多肽能够使 IL-1 β 、MCP-1 的 mRNA 表达和 NO 含量均明显下降;而 Δ 101CSD 多肽仅能使 MCP-1 的 mRNA 表达和 NO 含量明显下降。说明不同类型的多肽可能通过不同机制影响 AMs 炎性因子的表达特性。

综上所述,野生型 CSD 多肽可减少 LPS 诱导的 Cav-1 与 HO-1 结合,增加 HO-1 活性,促进 AMs 由 M1 表型向 M2 表型转化,抑制促炎因子表达,为治疗 LPS 引起的 ALI 提供了一种新方法。

参考文献

[1] Wang L, Cang J, Xue Z. Protective effects of thoracic epidural anesthesia on hypoxia-induced acute lung injury in rabbits [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11 (5): 2021–2027. DOI: 10.3892/etm.2016.3151.

[2] Min KJ, Yang MS, Kim SU, et al. Astrocytes induce hemeoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation [J]. *J Neurosci*, 2006, 26 (6): 1880–1887. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3696-05.2006.

[3] 高小伟,孙耕耘,尤青海. IL-17F/IL-17RC 对大鼠肺微血管内皮细胞小窝蛋白 1 表达的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2015, 95 (12): 938–942. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2015.12.015.

Gao XW, Sun GY, You QH. Effects of IL-17F/IL-17RC on the expression of caveolae-1 in rat pulmonary microvascular endothelial cells [J]. *Natl Med J China*, 2015, 95 (12): 938–942. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2015.12.015.

[4] Hehlhans S, Cordes N. Caveolin-1: an essential modulator of cancer cell radio- and chemoresistance [J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1 (4): 521–530.

[5] 钟荣,肖军,于志辉,等.小窝蛋白-1/血红素加氧酶-1 信号轴对机械通气所致肺损伤调控效应的研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (7): 568–573. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.006.

Zhong R, Xiao J, Yu ZH, et al. Research on the effect of protection against ventilator-induced lung injury via regulation of caveolin-1/heme oxygenase-1 signaling [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (7): 568–573. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.006.

[6] Taira J, Sugishima M, Kida Y, et al. Caveolin-1 is a competitive inhibitor of heme oxygenase-1 (HO-1) with heme: identification of a minimum sequence in caveolin-1 for binding to HO-1 [J]. *Biochemistry*, 2011, 50 (32): 6824–6831. DOI: 10.1021/bi2006011.

[7] Hualin C, Wenli X, Dapeng L, et al. The anti-inflammatory mechanism of heme oxygenase-1 induced by hemin in primary rat alveolar macrophages [J]. *Inflammation*, 2012, 35 (3): 1087–1093. DOI: 10.1007/s10753-011-9415-4.

[8] 何俊,徐文莉,曾思,等.大鼠肺泡巨噬细胞原代培养技术的改良措施 [J]. *徐州医学院学报*, 2010, 30 (5): 325–327. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2065.2010.05.013.

He J, Xu WL, Zeng S, et al. Modifications of the primary culture technique for rat alveolar macrophages [J]. *Acta Acad Med Xuzhou*, 2010, 30 (5): 325–327. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2065.2010.05.013.

[9] Bernatchez PN, Bauer PM, Yu J, et al. Dissecting the molecular control of endothelial NO synthase by caveolin-1 using cell-permeable peptides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (3): 761–766. DOI: 10.1073/pnas.0407224102.

[10] Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, et al. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation [J]. *J Chem Theory Comput*, 2008, 4 (3): 435–47. DOI: 10.1021/ct700301q.

[11] Wu Y, Cao Z, Yi H, et al. Simulation of the interaction between ScyTx and small conductance calcium-activated potassium channel by docking and MM-PBSA [J]. *Biophys J*, 2004, 87 (1): 105–112. DOI: 10.1529/biophysj.103.039156.

[12] Wang XM, Kim HP, Nakahira K, et al. The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1 [J]. *J Immunol*, 2009, 182 (6): 3809–3818. DOI: 10.4049/jimmunol.0712437.

[13] Rosseau S, Hammerl P, Maus U, et al. Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279 (1): L25–35. DOI: 10.1152/ajplung.2000.279.1.L25.

[14] 尤青海,张丹,孙耕耘,等.小窝蛋白-1 在脂多糖致肺微血管内皮细胞炎性损伤中的作用探讨 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (12): 706–710. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.12.002.

You QH, Zhang D, Sun GY, et al. Role of caveolin-1 in pulmonary microvascular endothelial cells injury induced by lipopolysaccharide in rat [J]. *Chin Crit Care Med*, 2013, 25 (12): 706–710. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.12.002.

[15] Patel HH, Insel PA. Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11 (6): 1357–1372. DOI: 10.1089/ARS.2008.2365.

[16] Xia P, Chen HY, Chen SF, et al. The stimulatory effects of eNOS/F2A-Cav1 on NO production and angiogenesis in BMSCs [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 77: 7–13. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.11.001.

[17] Bernatchez P, Sharma A, Bauer PM, et al. A noninhibitory mutant of the caveolin-1 scaffolding domain enhances eNOS-derived NO synthesis and vasodilation in mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121 (9): 3747–3755. DOI: 10.1172/JCI44778.

[18] Johnston LK, Rims CR, Gill SE, et al. Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47 (4): 417–426. DOI: 10.1165/rmb.2012-00900C.